



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

«Βιοτεχνολογία - Ποιότητα διατροφής & περιβάλλοντος»

**«ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΑΜΠΕΛΟΥ ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ
ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Α»**

ΞΗΝΤΑΡΟΠΟΥΛΟΣ ΙΩΑΝΝΗΣ



ΛΑΡΙΣΑ – 2013

«Εκχυλίσματα αμπέλου ως αναστολείς της ριβονουκλεάσης Α»

«Grape extracts as inhibitors of ribonuclease A»

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Λεωνίδας Δημήτριος, Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Νικόλαος Μπαλατσός, Λέκτορας Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Στάγκος Δημήτριος, Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες,

*Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον επιβλέποντα καθηγητή μου **κ. Μπαλατσό** (Λέκτορας του τμήματος Βιοχημείας Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας) για την πολύτιμη βοήθεια του τόσο στην επιλογή όσο και στην διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας. Επίσης να ευχαριστήσω όλους όσους γνώρισα και συνεργάστηκα στο εργαστήριο δομικής και λειτουργικής βιοχημείας. Τέλος, ευχαριστώ την Χατζηλεοντιάδου Δήμητρα (διδασκατορική φοιτήτρια) για την πολύτιμη καθοδήγησή της.*

Περιεχόμενα

Περίληψη	6
Εισαγωγή	7
1. Ριβονουκλεάσες και Ασθένειες	9
1.1 Η Δομή της RNase A	11
1.2 Το ενεργό κέντρο της RNase A- Καταλυτική δράση	13
1.3 Καταλυτικός μηχανισμός	15
2. Ενζυμική αναστολή	18
2.1 Αναστολείς της RNase A	21
3. Φυτικά Εκχυλίσματα	24
3.1 Αναστολή Ενζύμων από Φυτικά Εκχυλίσματα	25
4. Σκοπός της Εργασίας	26
5. Υλικά και Μέθοδοι	27
5.1 Αντιδραστήρια-Υλικά	27
5.1.1 Αντιδραστήρια.....	27
5.1.2 Χημικά	27
5.1.3 Όργανα-Υλικά.....	28
5.2 Μέθοδοι.....	28
5.2.1 Κινητική μελέτη της ριβονουκλεάσης A.....	28
5.2.2 Περιγραφή της μεθόδου.....	29
5.2.3 Επεξεργασία κινητικών δεδομένων για τον υπολογισμό της IC50.....	31
6. Αποτελέσματα	33
6.1 Προσδιορισμός του IC50 της αναστολής του ενζύμου.....	34
7. Συζήτηση	38
Βιβλιογραφία	39

Περίληψη

Η παρούσα εργασία έχει στόχο την διερεύνηση πιθανών αναστολέων της ριβονουκλεάσης Α (RNάση Α) από πολυφαινολικά εκχυλίσματα αμπέλου. Η RNάση Α και η ευρύτερη οικογένεια των ριβονουκλεασών αποτελούν ένζυμα στόχους με μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών προσεγγίσεων. Εξετάστηκε η αναστολή που προκαλείται στην δράση του ενζύμου από εκχυλίσματα διαφόρων τμημάτων του φυτού της αμπέλου της ποικιλίας Ασσύρτικου. Χρησιμοποιήθηκε κινητική μελέτη για τον προσδιορισμό της τιμής της IC50 της αναστολής που παρατηρήθηκε από τα εκχυλίσματα. Τα αποτελέσματα της έρευνας δείχνουν ότι τα εκχυλίσματα αυτά αναστέλλουν σημαντικά την δράση της RNάσης Α

Abstract

The present work aims to investigate possible inhibition of Ribonuclease A by polyphenolic grape extracts. RNase A and the Ribases are of great scientific interest for the development of innovating drugs. We examined the inhibition caused by extracts from various parts of the grape plant of assyrtico variety. We studied the kinetisc effects to identify the value of the IC50 of the inhibition caused by those extracts. The results of the present research show that polyphenolic grape extracts stimulate a conciderable inhibitory effect on the activity of RNase A.

Εισαγωγή

Η ριβονουκλεάση Α ήταν από τα πρώτα ένζυμα που απομονώθηκαν (1938) και κρυσταλλώθηκαν (1939) και αποτέλεσε το αγαπημένο θέμα των δομικών και λειτουργικών μελετών από το 1950 έως και το 1960. Σε αυτό συνέβαλε η θερμοσταθερότητα που την χαρακτηρίζει και η διαθεσιμότητά της λόγω της υψηλής συγκέντρωσής της στον παγκρεατικό ιστό. Η παγκρεατική ριβονουκλεάση Α είναι μια ενδοριβονουκλεάση μοριακού βάρους 13.7 kDa, η οποία καταλύει την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών στις αλυσίδες του RNA μέσω δύο διαδοχικών αντιδράσεων, μιας τρανσφωσφορυλίωσης και μιας υδρόλυσης.

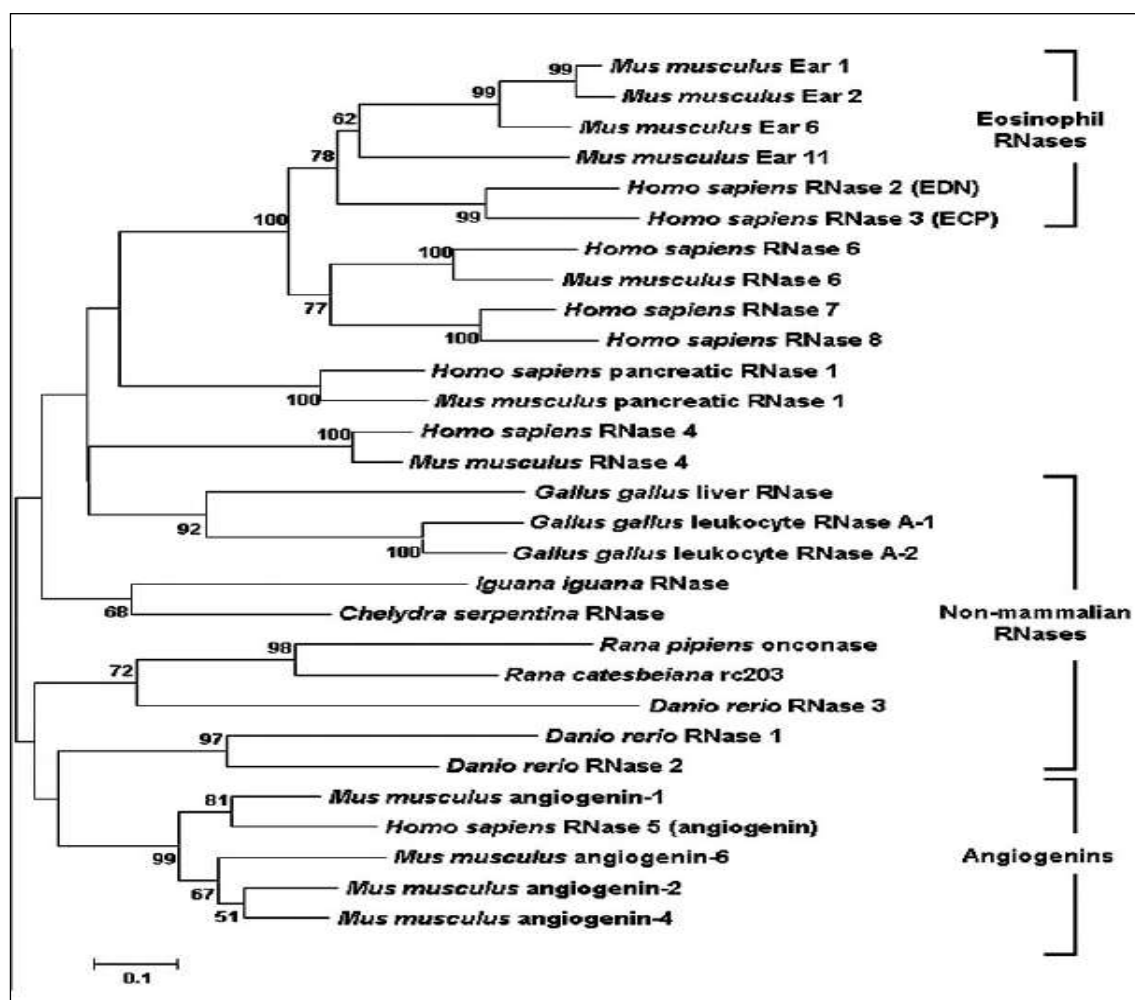
Η ριβονουκλεάση Α αποτέλεσε το πρώτο μοντέλο πρωτεΐνης για πολλές φασματοσκοπικές μεθόδους προσδιορισμού δομής. Χρησιμοποιήθηκε από τον Christian Anfinsen για να αποδείξει ότι η αλληλουχία των αμινοξέων καθορίζει τη δομή μιας αναδιπλωμένης πρωτεΐνης. Οι Stanford Moore και William Stein με τη βοήθεια της RNase A, απέδειξαν ότι συγκεκριμένα κατάλοιπα βρίσκονται στο καταλυτικό κέντρο κάθε ενζύμου. Τέλος, ο R. Bruce Merrifield με τη χρήση αυτής της πρωτεΐνης απέδειξε ότι τα βιολογικά μόρια είναι απλές χημικές ουσίες που μπορούν να κατασκευαστούν τεχνητά. Όλες αυτές οι ανακαλύψεις χάρη στην RNase A βραβεύθηκαν με το βραβείο Nobel (D'Alessio & Riordan, 1997).

Η παγκρεατική ριβονουκλεάση Α από βοοειδή, κατέχει εξέχουσα θέση στη μοριακή βιολογία. Ήταν το πρώτο ένζυμο και η τρίτη πρωτεΐνη που αλληλουχήθηκε, ενώ η κρυσταλλογραφική δομή της προσδιορίστηκε πριν από πενήντα χρόνια. Έχουν καθοριστεί πάνω από εκατό ομόλογα της RNase A σε όλα τα τετράποδα, ενώ πρόσφατα προσδιορίστηκε μια υπεροικογένεια ριβονουκλεασών στα μηρυκαστικά, στην οποία κατέχει εξέχουσα θέση η RNase A.

Το 1980 απομονώθηκαν πολλές πρωτεΐνες από άλλους ιστούς, φαινομενικά μη σχετιζόμενες με την παγκρεατική ριβονουκλεάση Α. Μετά από κλωνοποίηση και αλληλούχηση των γονιδίων τους βρέθηκε ότι παρουσιάζουν σημαντική ομολογία με την παγκρεατική ριβονουκλεάση Α. Οι πρωτεΐνες αυτές έγιναν μέλη της υπεροικογένειας της Ριβονουκλεάσης Α. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται και η

αγγειογενίνη (ριβονουκλεάση 5), η ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη (ECP: ριβονουκλεάση 3), η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN: ριβονουκλεάση 2) και μερικές άλλες ακόμα κυτταροτοξίνες. Ένα φυλογενετικό δέντρο των ριβονουκλεασών αυτής της υπεροικογένειας φαίνεται στην Εικόνα 1.

Όλες οι ριβονουκλεάσες αυτής της υπεροικογένειας στην δραστική τους μορφή έχουν μερικές χαρακτηριστικές αλληλουχίες. Περιέχουν από 6–8 κατάλληλα τοποθετημένες κυστεΐνες που σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς και όλες έχουν 2 ιστιδίνες και μία λυσίνη, όπου τα παραπάνω παρουσιάζουν ένα σταθερό μοτίβο αλληλουχίας (CKXXNTF). Τέλος, κατά κανόνα οι ριβονουκλεάσες αυτής της υπεροικογένειας βρίσκονται σε ένα μόνο εξόνιο στο χρωμόσωμα 14 (Rosenberg et al, 2008).



Εικόνα 1: Φυλογενετικό δέντρο της υπεροικογένειας της ριβονουκλεάσης A.

1. Ριβονουκλεάσες και Ασθένειες

Στον γενικό όρο RISBASES (Ribonucleases with Special Biological Actions) περιλαμβάνονται ριβονουκλεάσες με διάφορες βιολογικές λειτουργίες πέρα από την συνήθη καταλυτική τους δράση ως ένζυμα (D' Alessio et al., 1991). Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια προσπάθεια αξιοποίησης των ριβονουκλεασών στην θεραπεία του καρκίνου. Έχει παρατηρηθεί ότι πολλές από αυτές έχουν αντικαρκινική δράση ενώ άλλες προάγουν τη δημιουργία όγκων.

Χαρακτηριστικά, η βοεΐα σπερματική ριβονουκλεάση (BS-RNase), μία ομοδιμερής ριβονουκλεάση της οικογένειας της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A (RNase A), είναι ένας αποτελεσματικός ογκοκατασταλτικός παράγοντας, με σημαντική αντιμεταστατική δράση. Αν και δεν έχουν ερευνηθεί όλα τα στάδια του μηχανισμού της ογκοκατασταλτικής δράσης, έχει ωστόσο αποδειχθεί ότι η καταλυτική δραστηριότητα και η διμερής μορφή της πρωτεΐνης έχουν καθοριστικό ρόλο στην κυτταροτοξική δραστηριότητα του ενζύμου. (Cafaro et al, 1998)

Επίσης, αρκετά βιολογικά πειράματα έχουν δείξει ότι η αγγειογενίνη (Εικόνα 2) είναι από τους πιο σημαντικούς παράγοντες ανάπτυξης όγκων, καθώς προωθεί την αγγειογένεση (Fett et al., 1987). Ουσιαστικά με την αγγειογένεση επιτυγχάνεται η τροφοδοσία των καρκινικών κυττάρων με θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο. Ταυτόχρονα διευκολύνεται και η κυκλοφορία των καρκινικών κυττάρων μέσω του αίματος με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταστάσεων. Η βιολογική δράση της αγγειογενίνης εξαρτάται απόλυτα από την ενζυμική της δραστηριότητα. Επομένως, αναστολείς ή μεταλλάξεις που παρεμποδίζουν τη ριβονουκλεολυτική της δραστηριότητα ταυτόχρονα εμποδίζουν και την αγγειογενετική της δράση επιβραδύνοντας την ανάπτυξη των όγκων (Kao et al., 2002). Αντίστοιχα, μεταλλάξεις οι οποίες ενισχύουν την δράση του ενζύμου, ενισχύουν την δραστηριότητα της αγγειογένεσης (Bond et al, 1990; Curran et al, 1993; Hallahan et al, 1992; Rybak et al, 1989; Shapiro et al, 1989).

Αντιλαμβανόμαστε ότι οι ριβονουκλεάσες μπορούν να αποτελέσουν ένα σημαντικό όπλο ενάντια στον καρκίνο. Το σκεπτικό για την χρήση των

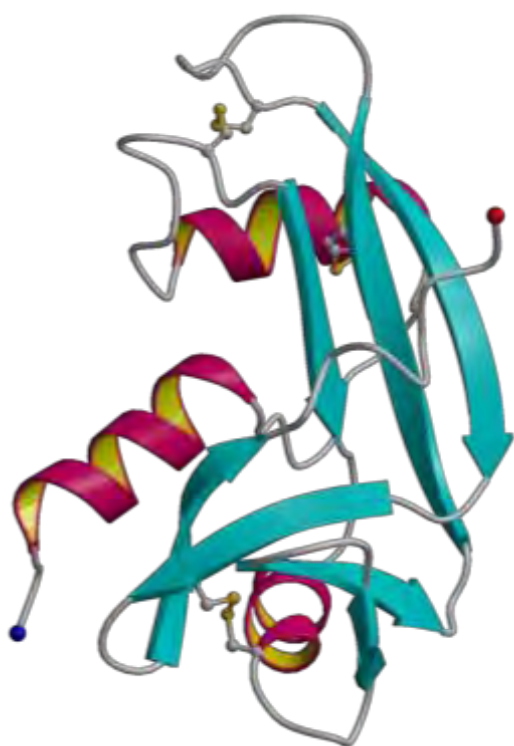
ριβονουκλεασών χωρίζεται σε δύο φάσεις. Η ιδιότητα τους ως κυτταροτοξικοί παράγοντες των καρκινικών κυττάρων μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία μιας νέας κατηγορίας ‘φυσικών’ φαρμάκων ενάντια διαφόρων τύπων καρκίνου, χωρίς τις παρενέργειες της τυποποιημένης χημειοθεραπείας. Ταυτόχρονα, θα πρέπει να αναπτυχθεί κάποιος ισχυρός αναστολέας που να αναστέλλει την αγγειογενίνη, ώστε να εμποδιστεί η ανάπτυξη του όγκου. Παράλληλα θα γίνει χορήγηση των ριβονουκλεασών με αντικαρκινική δράση, οι οποίες δε δεσμεύονται από τον πρωτεϊνικό αναστολέα RI, οδηγώντας στην καταστολή του όγκου (Leland, 1998).

Προκειμένου να δημιουργήσουμε αναστολείς της αγγειογενίνης χρησιμοποιούμε ως “μοντέλο” την ριβονουκλεάση A, καθώς εμφανίζει μεγάλη αμινοξική και δομική ομολογία με την αγγειογενίνη ιδιαίτερα στο καταλυτικό κέντρο που φτάνει το 100%. Επομένως, χρησιμοποιώντας ως μοριακά μοντέλα εκκίνησης αναστολείς της RNase A, με τον κατάλληλο σχεδιασμό είναι δυνατό να ανακαλυφθούν νέοι ισχυροί και εξειδικευμένοι αναστολείς της αγγειογενίνης. Τέτοιοι αναστολείς μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων (Leonidas et al, 2003)

Τέλος έχουν βρεθεί RISBASES με αντιική δράση. Η ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη (ECP) που απομονώθηκε από ανθρώπινα εκκρινόμενα λευκοκύτταρα, βρέθηκε να έχει τοξικότητα κατά εξωκυττάρων λοιμογόνων παραγόντων και RNA-ιών μονής έλικας. Ακόμα βρέθηκε πως η ανασυνδιασμένη ανθρώπινη ηωσινόφιλη (rhEDN) μπορεί να δράσει αυτόνομα ως αντιικός παράγοντας (Domachowske 1998).

1.1 Η Δομή της RNase A

Η RNase A είναι μια ενδονουκλεάση που καταλύει τον αποπολυμερισμό μονόκλωνων mRNA, σπάζοντας τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ γειτονικών ριβονουκλεοτιδίων, που είναι συνδεδεμένα κυρίως με πυριμιδίνες. Πρόκειται για μια μικρή πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 13.686 Da, ενώ η πολυπεπτιδική της αλυσίδα αποτελείται από 124 κατάλοιπα, τα περισσότερα από τα οποία είναι βασικά.



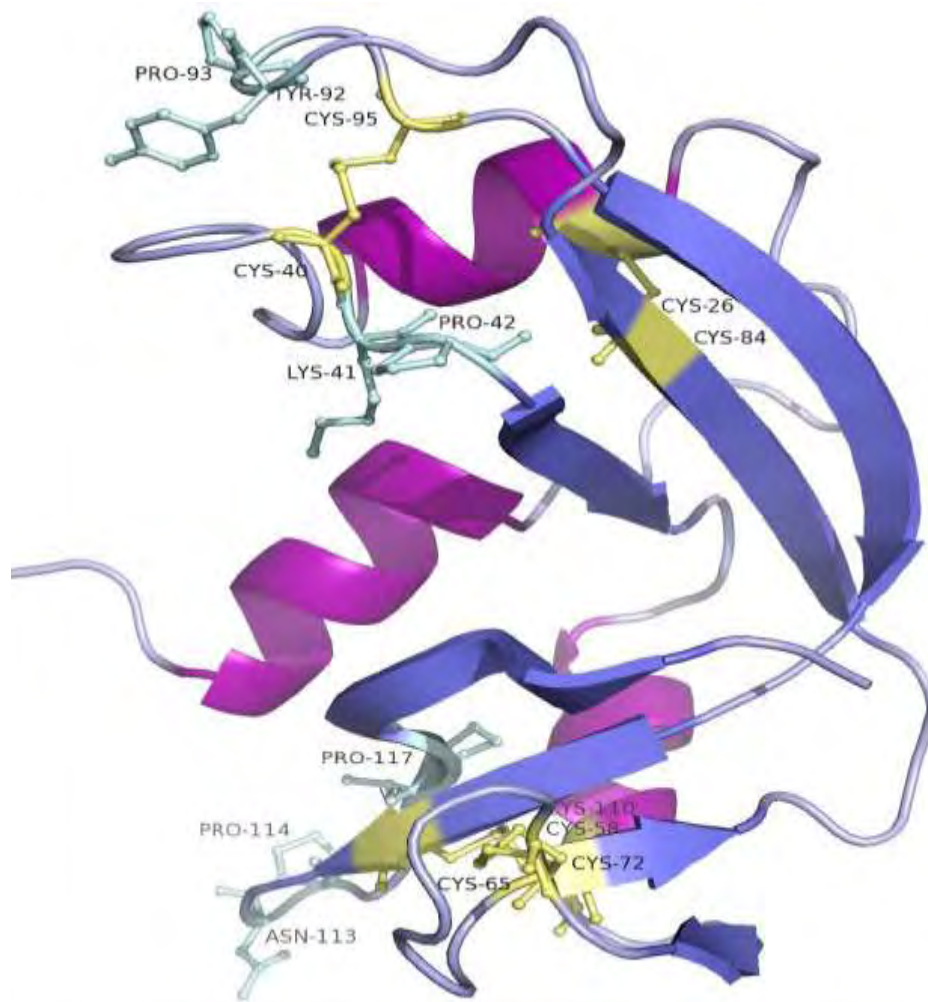
Εικόνα 2: Η δομή της ανθρώπινης αγγειογενίνης.



Εικόνα 3: Η δομή της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A

Η δευτεροταγής δομή της RNase A (Εικόνα 3) αποτελείται από τρεις α -έλικες και επτά αντιπαράλληλα β -φύλλα, ενώ σχηματίζονται τέσσερις δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ 8 καταλοίπων Cys : 26-84, 40-95, 58-110, 67-72.. Το N-τελικό της άκρο περιλαμβάνει μια α -αλυσίδα, ενώ συνδέεται με το κύριο σώμα της πρωτεΐνης με

έναν ευκίνητο βρόχο. Το C-τελικό άκρο σχηματίζει μια φουρκέτα που αποτελείται από δυο β-φύλλα και περιέχει κυρίως υδρόφοβα κατάλοιπα σε αντίθεση με το N-τελικό άκρο.



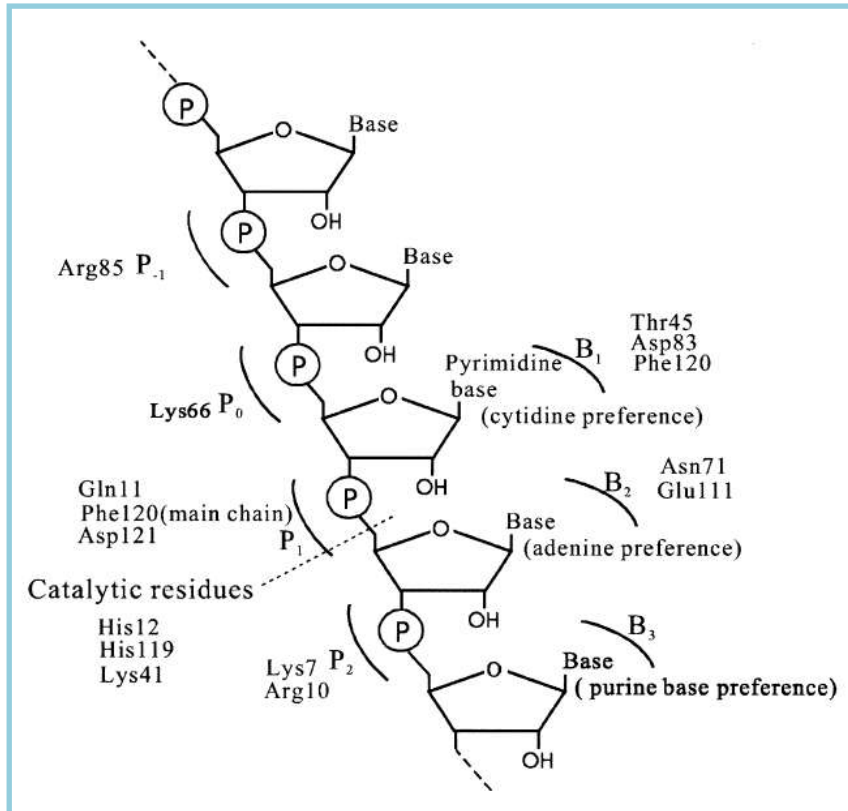
Εικόνα 4: Οι δισουλφιδικοί δεσμοί και οι πεπτιδικοί X-Pro της βόειας παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A

1.2 Το ενεργό κέντρο της RNase A- Καταλυτική δράση

Το ενεργό κέντρο του ενζύμου είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων του υποστρώματος RNA. Έχει ειδικότητα πρόσδεσης στις πυριμιδίνες της 3' θέσης του φωσφοδιεστερικού δεσμού που υδρολύεται και στις πουρίνες της 5' θέσης που συνήθως ακολουθείται από γουανίνη.

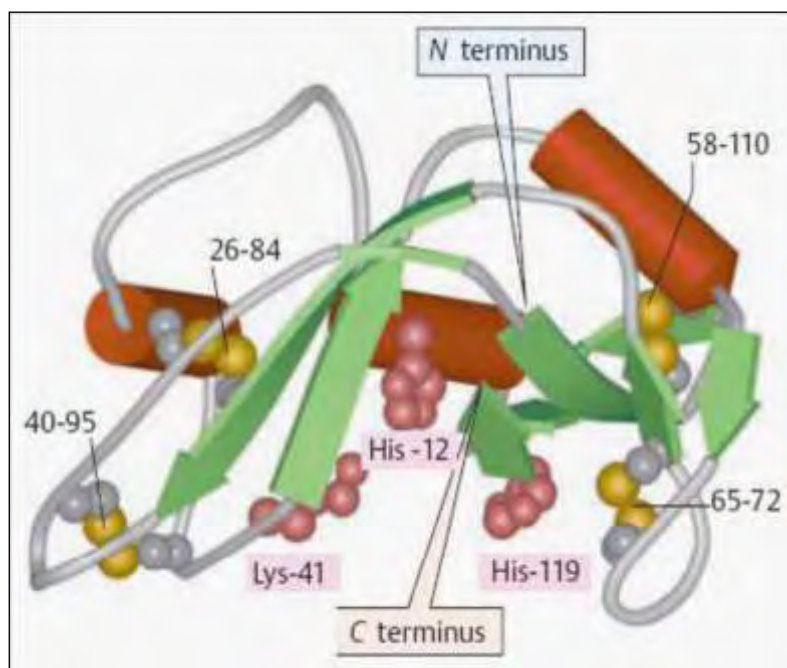
Το ενεργό κέντρο της RNase A σχηματίζεται από τρία κύρια κατάλοιπα: την His 12, την His 119 και τη Lys 41. Οι δύο His, όπως περιγράφεται παρακάτω, είναι υπεύθυνες για την υδρόλυση του φωσφοδιεστερικού δεσμού, ενώ η Lys λόγω του θετικού της φορτίου αλληλεπιδρά με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες. Αντικατάσταση των His 12 και His 119 από κατάλοιπα Asp 12 ή Glu 12, είχε ως αποτέλεσμα όχι μόνο τη μείωση της καταλυτικής δράσης του ενζύμου, αλλά και την αποσταθεροποίησή του, γεγονός που αποδεικνύει τον κυρίαρχο ρόλο των δυο αυτών καταλοίπων στη λειτουργία της ενδονουκλεάσης.

Ένα όχι πρωτεύον αλλά εξίσου σημαντικό κατάλοιπο του ενεργού κέντρου είναι η Thr 45. Το κατάλοιπο αυτό δε συμμετέχει άμεσα στην καταλυτική δράση του ενζύμου, αλλά έχει πολλαπλούς ρόλους τόσο στην ειδικότητα του ενζύμου για τα νουκλεοτίδια, όσο και για την αναδιοργάνωση του υποστρώματος. Συγκεκριμένα, η Thr 45 έχει την ικανότητα να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με μια κυτοσίνη ή ουρακίλη του ενεργού κέντρου του συνδεδεμένου υποστρώματος. Αυτοί οι δεσμοί επηρεάζουν την προτίμηση της RNase A για κυτοσίνη παρά για ουρακίλη. Έτσι, η ειδικότητα του ενζύμου για poly(C) είναι μεγαλύτερη από ότι για poly(A), ενώ δεν έχει καθόλου ειδικότητα για poly(G).



Εικόνα 5: Απεικόνιση των περιοχών πρόσδεσης του υποστρώματος

Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις των αμινοξέων του ενεργού κέντρου δεν είναι αποκλειστικά υπεύθυνες για την πρόσδεση του υποστρώματος. Υπάρχουν κατάλοιπα σε μη καταλυτικές υπομονάδες της RNase A που αλληλεπιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες του υποστρώματος. Έτσι, εκτός από το υποκέντρο p_1 , που αποτελεί το ενεργό κέντρο, υπάρχουν δύο ακόμα υποκέντρα, το p_2 που περιλαμβάνει τα βασικά κατάλοιπα Lys 7 και Arg 10 και το p_0 που περιλαμβάνει την Lys 66 (Εικόνα 5). Στο p_2 προσδένονται οι φωσφορικές ομάδες που βρίσκονται γειτονικά της 3' θέσης κοπής, ενώ στο p_0 προσδένονται οι φωσφορικές ομάδες που βρίσκονται γειτονικά της 5' θέσης. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις του υποκέντρου p_2 είναι σημαντικές τόσο στην κατάλυση όσο και στη δραστικότητα ενδονουκλεάσης, ενώ το υποκέντρο p_0 συνεισφέρει μόνο στην πρόσδεση του RNA.



Εικόνα 6: Το καταλυτικό κέντρο της *RNase A*

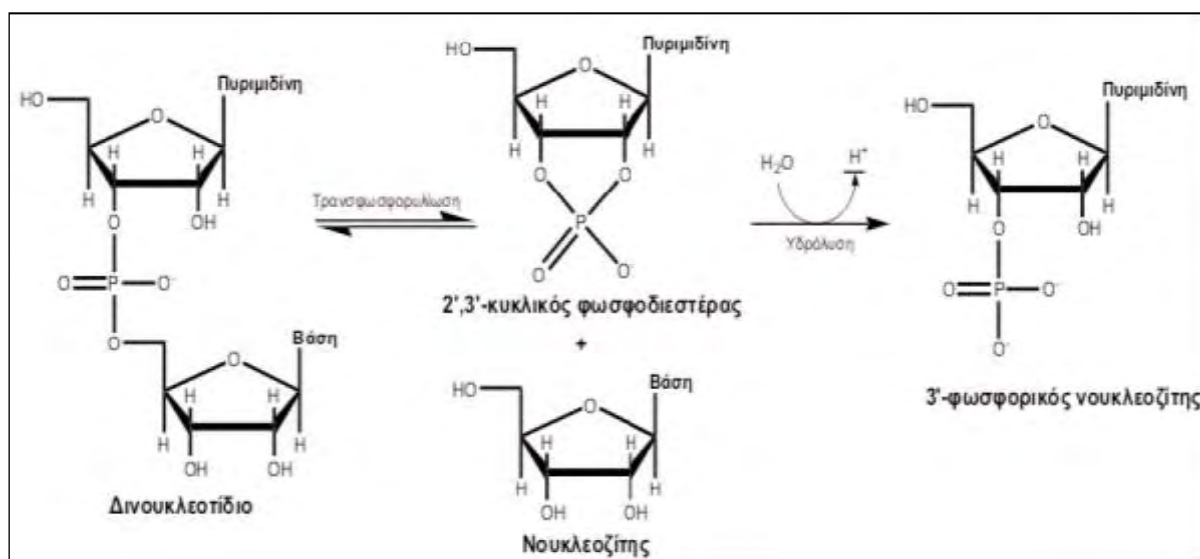
1.3 Καταλυτικός μηχανισμός

Όπως έχει προαναφερθεί, η ριβονουκλεάση A καταλύει την διάσπαση φωσφοδιεστερικών δεσμών του RNA. Η υδρόλυση που καταλύεται από την ριβονουκλεάση A γίνεται σε δύο στάδια, μέσω ενός 2',3'-κυκλικού φωσφοδιεστέρα (Εικόνα 7). Στο πρώτο στάδιο, γίνεται η τρανσφωσφορυλίωση του 3',5'-φωσφοδιεστερικού δεσμού από την 5' θέση του ενός νουκλεοτιδίου στην 2' θέση του γειτονικού. Αποτέλεσμα είναι η διάσπαση του δεσμού του υποστρώματος, ο σχηματισμός ενός 2',3'-κυκλικό-φωσφοδιεστέρα με ελεύθερο το 3'-φωσφορικό άκρο και η απελευθέρωση μιας 5'-OH ομάδας. Στο δεύτερο στάδιο, γίνεται η υδρόλυση του 2',3'-κυκλικού-φωσφοδιεστέρα δίνοντας μια 3'-μονοφωσφορική ομάδα (Moussaoui et al,1998).

Η αντίδραση τρανσφωσφορυλίωσης είναι ταχύτερη και αντιστρεπτή σε σχέση με την υδρόλυση, η οποία είναι πρακτικά μη αντιστρεπτή. Ο 2',3'-κυκλικός-φωσφοδιεστέρας δεν είναι ένα ενδιάμεσο, αλλά κανονικό προϊόν καθώς απελευθερώνεται μετά την τρανσφωσφορυλίωση. Το στάδιο της υδρόλυσης δεν

ξεκινά παρά μόνο όταν δεν υπάρχει πλέον υπόστρωμα για τρανσφωσφορυλίωση (Stryer et al,2002).

Το νουκλεοτίδιο, το οποίο βρίσκεται στην 3'-πλευρά του δεσμού του υποστρώματος που διασπάται από το ένζυμο πρέπει να είναι μια πυριμιδίνη, γιατί ο πουρινικός δακτύλιος είναι πολύ μεγάλος για να χωρέσει στο ενεργό κέντρο χωρίς να το στρεβλώσει.



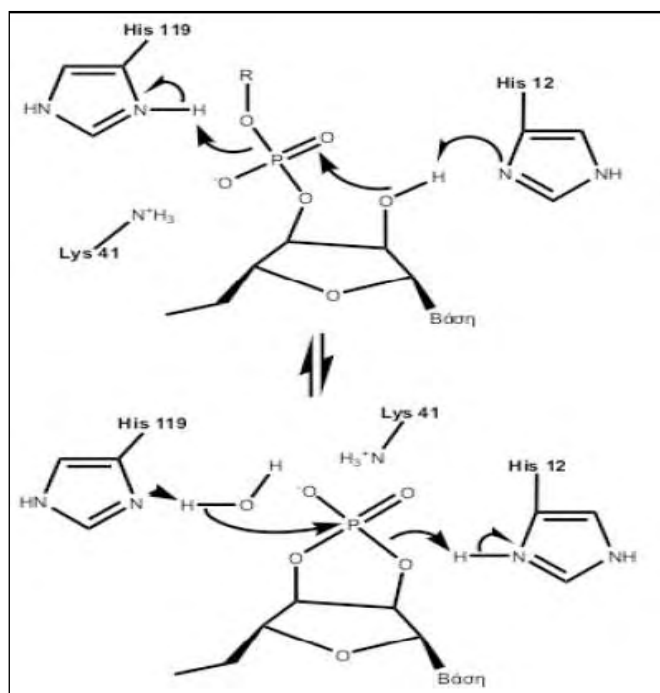
Εικόνα 7: Η αντίδραση που καταλύεται από την ριβονουκλεάση A

Όπως είδαμε, τα κατάλοιπα που παίζουν ρόλο στην κατάλυση είναι η His12, His119 και η Lys41 (Εικόνα 7). Η αντίδραση αρχίζει με την προσβολή του φωσφόρου του δεσμού που διασπάται από το 2'-O με τον ακόλουθο τρόπο: πρώτα, η μη ιοντισμένη μορφή της His12 προσλαμβάνει ένα πρωτόνιο από το 2'-OH, το οποίο αυξάνει τον πυρηνόφιλο χαρακτήρα αυτού του O. Την ίδια στιγμή η πρωτονιωμένη μορφή της His119 παρέχει το πρωτόνιό της στο 5'-O, και το 2'-O σχηματίζει δεσμό με το P, ο οποίος μεταβατικά σχηματίζει δεσμούς με πέντε άτομα οξυγόνου. Αυτή η πεντασθενής μεταβατική κατάσταση σταθεροποιείται ηλεκτροστατικά από τη θετικά φορτισμένη πλευρική αλυσίδα της Lys41 που βρίσκεται πολύ κοντά. Ο δεσμός μεταξύ P και του 5'-O διασπάται όταν το πρωτόνιο από την His119 έχει μεταφερθεί πλήρως σε αυτό το άτομο O. Την ίδια στιγμή, σχηματίζεται μεταξύ του P και του 2'-O παράγοντας το 2',3'-κυκλικό ενδιάμεσο.

Το δεύτερο στάδιο αυτής της αντίδρασης, που είναι η υδρόλυση του κυκλικού ενδιαμέσου, είναι σχεδόν μία αντίστροφη πορεία του πρώτου σταδίου με τη

διαφορά ότι ένα μόριο ύδατος αντικαθιστά το 5'-Ο που είχε απομακρυνθεί. Τώρα ο δότης πρωτονίων είναι η His12 και ο δέκτης πρωτονίων είναι η His119. Η παρουσία της His στο ενεργό κέντρο πολλών ενζύμων οφείλεται στην ικανότητα της να δρα είτε ως οξύ είτε ως βάση σε φυσιολογικό pH.

Η γεωμετρία της πεντασθενούς μεταβατικής κατάστασης έχει ενδιαφέρον. Όταν ο φώσφορος γίνει πεντασθενής, η γεωμετρία τετραέδρου του φωσφόρου στο RNA αλλάζει σε μια τριγωνική διπυραμίδα. Ο φώσφορος καταλαμβάνει το κέντρο, τρία άτομα οξυγόνου βρίσκονται στο ισημερινό επίπεδο και δύο στις κορυφές της διπυραμίδας. Κατά τον σχηματισμό του κυκλικού ενδιάμεσου, το απερχόμενο 5'-Ο βρίσκεται στη μία κορυφή και το εισερχόμενο 2'-Ο βρίσκεται στην άλλη κορυφή της διπυραμίδας. Κατά την υδρόλυση αυτού του ενδιάμεσου ένα άτομο Ο από το νερό βρίσκεται στη μία κορυφή και το 2'-Ο βρίσκεται στην άλλη. Σε κάθε στάδιο, μία κορυφή καταλαμβάνεται από την επιτιθέμενη πυρινόφιλη ομάδα και η άλλη κορυφή από την ομάδα που απομακρύνεται (Stryer et al,2002).



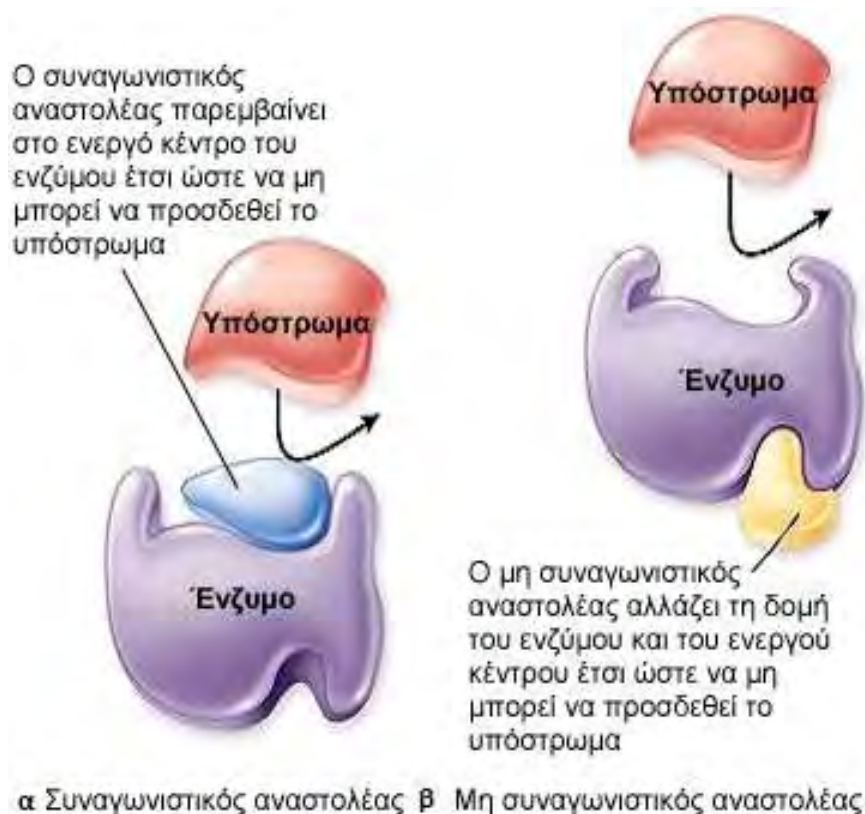
Εικόνα 8: Ο μηχανισμός κατάλυσης

2. Ενζυμική αναστολή

Η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε μη αντιστρεπτή. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας διαχωρίζεται πολύ αργά από το ένζυμο στόχο, διότι συνδέεται πολύ ισχυρά με το ένζυμο, είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά.

Η αντιστρεπτή αναστολή, σε αντίθεση με τη μη αντιστρεπτή αναστολή, χαρακτηρίζεται από έναν ταχύ διαχωρισμό του συμπλόκου ενζύμου – αναστολέα. Στη συναγωνιστική αναστολή το ένζυμο μπορεί να προσδένει υποστρώματα (σχηματίζοντας το σύμπλοκο ES) ή αναστολέα (EI), αλλά όχι και τα δύο (ESI). Ο συναγωνιστικός αναστολέας μοιάζει με το υπόστρωμα και προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Εικόνα 9). Ως εκ τούτου, το υπόστρωμα εμποδίζεται από το να προσδεθεί στο ίδιο ενεργό κέντρο. Ένας συναγωνιστικός αναστολέας ελαττώνει την ταχύτητα της κατάλυσης με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεδεμένα στο υπόστρωμα. Σε μια οποιαδήποτε συγκέντρωση του αναστολέα, η συναγωνιστική αναστολή μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Κάτω από αυτές τις συνθήκες το υπόστρωμα συναγωνίζεται τον αναστολέα για το ενεργό κέντρο. Στη μη συναγωνιστική αναστολή, η οποία είναι επίσης αντιστρεπτή, ο αναστολέας και το υπόστρωμα μπορούν να προσδένονται ταυτόχρονα σε ένα μόριο ενζύμου σε διαφορετικές περιοχές πρόσδεσης.

Ένας μη συναγωνιστικός αναστολέας δρα ελατώνοντας τον αριθμό μετατροπής ενός ενζύμου, παρά με το να ελαττώνει την αναλογία μορίων του ενζύμου που είναι προσδεδεμένα στο υπόστρωμα. Η μη συναγωνιστική αναστολή, σε αντίθεση με τη συναγωνιστική αναστολή, δεν μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Ένα πιο περίπλοκο σχήμα, που ονομάζεται μεικτή αναστολή παράγεται όταν ένας αναστολέας και επηρεάζει την πρόσδεση του υποστρώματος και μεταβάλλει τον αριθμό μετατροπής του ενζύμου.

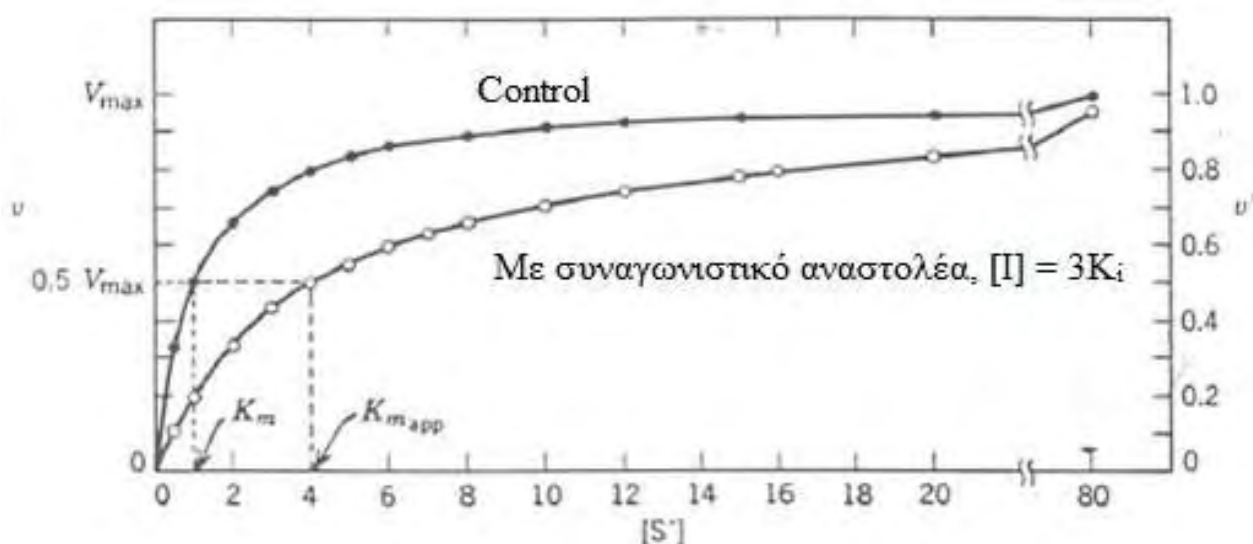


Εικόνα 9: α) Συναγωνιστική αναστολή: πρόσδεση του αναστολέα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της πρόσδεσης του υποστρώματος, β) Μη συναγωνιστική αναστολή: πρόσδεση του αναστολέα σε άλλη θέση και όχι στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Με αυτό τον τρόπο αλλάζει η δομή του ενζύμου και η πρόσδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του είναι αδύνατη.

Προκειμένου να γίνει μια διάκριση στο είδος της αναστολής θα πρέπει να γίνουν κινητικές μελέτες. Ουσιαστικά θα πρέπει να γίνουν οι μετρήσεις των ταχυτήτων της κατάλυσης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος και αναστολέα. Στη συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας συναγωνίζεται με το υπόστρωμα για το ενεργό κέντρο. Η σταθερά αναστολής (K_i) δίνεται από τη σχέση: $K_i = [E][I]/[EI]$. Όταν υπάρχει συναγωνιστικός αναστολέας, η ταχύτητα μπορεί να φτάσει τη μέγιστη τιμή (V_{\max}), όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα 8, διότι αυξάνοντας την ποσότητα του υποστρώματος η αναστολή μπορεί να υπερνικηθεί. Εντούτοις, η φαινομενική τιμή της K_M , μεταβάλλεται. Αυτή η νέα τιμή της K_M , που καλείται K_M^{app} είναι αριθμητικά ίση με

$$K_M^{app} = K_M (1 + [I]/K_i),$$

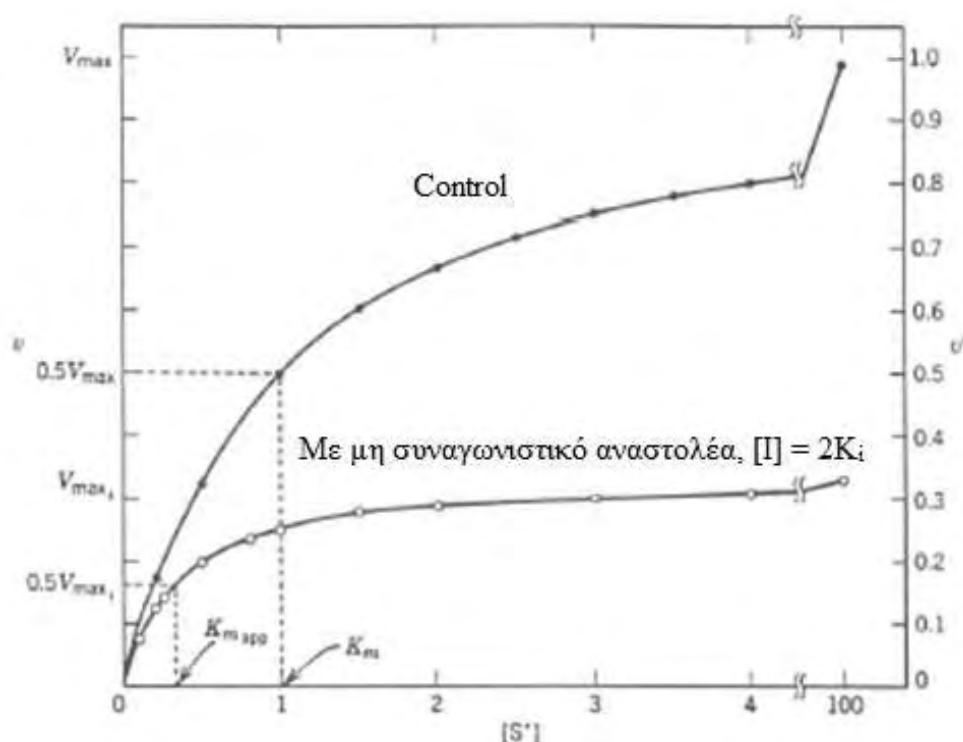
όπου $[I]$ είναι η συγκέντρωση του αναστολέα και K_i είναι η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου – αναστολέα. Καθώς αυξάνεται η τιμή $[I]$, αυξάνεται και η τιμή K_M^{app} . Ένα ένζυμο θα έχει την ίδια V_{max} όταν υπάρχει συναγωνιστικός αναστολέας, όπως και όταν δεν υπάρχει.



Εικόνα 10: Διάγραμμα της ταχύτητας μιας ενζυμικής αντίδρασης ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος παρουσία και απουσία συναγωνιστικού αναστολέα

Στη μη συναγωνιστική αναστολή (Εικόνα 11), το υπόστρωμα μπορεί να προσδένεται στο σύμπλοκο ενζύμου – αναστολέα. Εντούτοις, το σύμπλοκο ενζύμου– αναστολέα –υποστρώματος δεν παράγει προϊόν. Η τιμή της V_{max} ελαττώνεται σε μια νέα τιμή που καλείται V_{max}^{app} ενώ δεν αλλάζει η τιμή της K_M . Στην ουσία ο αναστολέας ελαττώνει τη συγκέντρωση του λειτουργικού ενζύμου. Το ένζυμο που απομένει συμπεριφέρεται ως ένα περισσότερο αραιό διάλυμα του ενζύμου. Η μη

συναγωνιστική αναστολή δεν μπορεί να υπερνικηθεί με την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος.



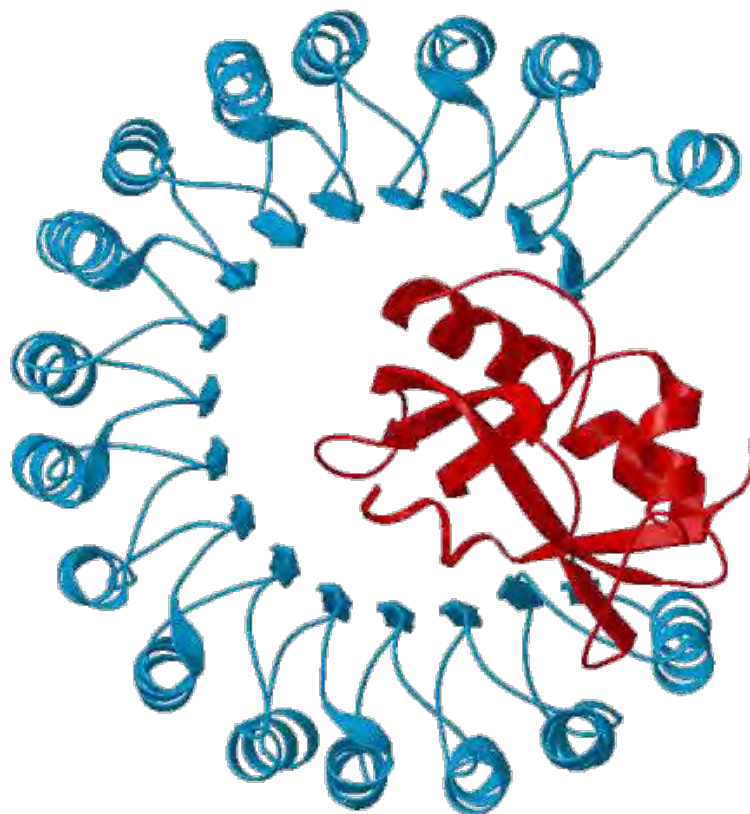
Εικόνα 11: Διάγραμμα της ταχύτητας μιας ενζυμικής αντίδρασης ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος παρουσία και απουσία μη συναγωνιστικού αναστολέα.

2.1 Αναστολείς της RNase A

Έχουν γίνει πολλές κρυσταλλογραφικές και κινητικές μελέτες προκειμένου να προσδιοριστούν αποτελεσματικοί αναστολείς. Ο κυριότερος αναστολέας της ριβονουκλεάσης A είναι ο φυσικός αναστολέας ριβονουκλεάσης (RI-ribonuclease inhibitor), μια πρωτεΐνη 50kDa, η οποία προστατεύει το κυτταροπλασματικό RNA από τυχόν παγκρεατικές ριβονουκλεάσες. Η τιμή της K_i για το σύμπλοκο RI-RNase A είναι $4,4 \cdot 10^{-14}$ M [Lee et al,1989] και $6,7 \cdot 10^{-14}$ M [Vincentini et al,1990].

Οι πρώτες έρευνες επικεντρώθηκαν σε απλά μονονουκλεοτίδια και δινουκλεοτίδια ή παράγωγα αυτών. Οι πιο αποτελεσματικοί αναστολείς που αναγνωρίστηκαν (pT-3'-p, pU-2'(3')-p, pA-3'-p, C-2'-p, U-2'-p) επιδεικνύουν χαμηλή σταθερά διάστασης στις

τιμές βέλτιστου pH 6.6. Οι τιμές K_i εξαρτώνται άμεσα από το pH και την ιονική ισχύ, γι' αυτό και σύγκριση μεταξύ των αναστολέων πραγματοποιείται μόνο στην περίπτωση που έχουμε ίδιες συνθήκες.



Εικόνα 12: Η δομή του συμπλόκου RI-RNase A

Μελετήθηκαν, επίσης, μονονουκλεοτίδια και διονουκλεοτίδια της 5'-πυροφωσφορικής αδενοσίνης ως αναστολείς (Leonidas et al.1997,1999, Russo et al. 1997, Russo and Shapiro.1999, Jardine et al.2001). Η ανάπτυξη τους βασίστηκε στην παρατήρηση ότι το 5'-ADP (ppA, $K_i=1.2\mu\text{M}$) προσδένεται 67 φορές πιο ισχυρά στην ριβονουκλεάση από το 5'-AMP (pA). Οι τιμές των K_i των συμπλόκων βρέθηκαν ίσες με $0.24\mu\text{M}$ και $0.52\mu\text{M}$ αντίστοιχα [Leonidas et al.1997,1999, Russo et al. 1997].

Στην συνέχεια, προσδιορίστηκαν οι κρυσταλλικές δομές της ριβονουκλεάσης A με τον ppA-3'-p και τον ppA-2'-p, στις οποίες βασίστηκε ο σχεδιασμός ενώσεων με ισχυρότερη πρόσδεση (Leonidas et al.1997). Αργότερα δοκιμάστηκαν ο dUpp-A-3'-p(5'-φωσφο-2'-δεοξουριδίνη 3'-πυροφωσφορικός P'→5' εστέρας με 3'-φωσφορική αδενοσίνη) και ο αντίστοιχος εστέρας με ουριδίνη

(Leonidas et al,1999). Η συγγένεια του dUpp-A-3'-p και του U2'pp-A-3'-p με την ριβονουκλεάση ήταν δύο φορές μεγαλύτερη από αυτή της ppA-3'-p σε pH 5.9. Η καθοριστική συμβολή του pH στην πρόσδεση ευνοούσε μόνο την πρόσδεση του νουκλεοτιδίου 3'→5' και έτσι μόνο αυτό χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω βελτίωση. Μελέτες μοντελισμού του συμπλόκου ριβονουκλεάσης A - dUpp-A-3'-p υποδήλωνε ότι η επέκταση του αναστολέα κατά μία 5'-φώσφορική ομάδα θα δημιουργούσε επιπλέον αλληλεπιδράσεις με την P₁ υποπεριοχή. Η K_i του pdUpp-A-3'-p (27nM) όντως βρέθηκε αρκετά μικρότερη από αυτή του dUpp-A-3'-p [Leonidas et al.1999, Russo and Shapiro,1999].

Πρόσφατα, μια νέα τάξη αναλόγων νουκλεοσιδίων αναγνωρίστηκαν ως αναστολείς της RNase A, με διαφορετικό μηχανισμό αναστολής. Πρόκειται για 5'-δεόξυ-5' μορφόλινο, πιπερίδινο και πυρολίδινο συνθετικά ανάλογα νουκλεοσιδίων πυριμιδίνης, τα οποία μπορούν να αναστείλουν την ενζυμική δράση της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A, ακολουθώντας κινητική συναγωνιστικής αναστολής με σταθερά αναστολής 103 μM.

Η μελέτη με κρυσταλλογραφία ακτίνων X έδειξε πως όλοι οι αναστολείς προσδένονται στην RNase A προσδένοντας τη φωσφορική τους ομάδα μακριά από το ενεργό κέντρο p₁ και κοντά στην υπομονάδα p₀. Η χρήση συνθετικών αναλόγων νουκλεοσιδίων δεν είναι τυχαία, καθώς έχειδειχθεί πως έχουν αντικαρκινική δράση και για ορισμένα από αυτά έχει βρεθεί πως ένας τουλάχιστον μοριακός στόχος είναι μια εξωνουκλεάση.

3. Φυτικά Εκχυλίσματα

Η χρήση φυτών για θεραπευτικούς σκοπούς χάνεται στα βάθη της ανθρώπινης ιστορίας. Στις μέρες μας αποτελεί ένα σημαντικό πεδίο έρευνας η μελέτη βιολογικώς ενεργών εκχυλισμάτων από φυτά που χρησιμοποιούνταν στην παραδοσιακή θεραπευτική πρακτική. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι πολλά φαρμακευτικά φυτά από διάφορες περιοχές του κόσμου, έχουν σημαντικές αντιβακτηριδιακές ιδιότητες, ενώ έχουν μελετηθεί και αποδειχθεί και άλλες φαρμακευτικές ιδιότητες τέτοιων φυτών. Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι στην Αίγυπτο, οι Atta & Mounieir (2004) ερευνώντας μεθανολικά εκχυλίσματα τοπικών φυτών, βρήκαν ότι ορισμένα έχουν σημαντική αντιδιαρροϊκή δράση. Επιπλέον οι Kudi & Myint (1999) διερευνώντας την αντιική δράση 17 τοπικών φυτών της Νιγηρίας, διαπίστωσαν ότι έξι φυτικά εκχυλίσματα είχαν σημαντικές αντιικές ιδιότητες σε συγκεντρώσεις μη τοξικές για τα κύτταρα.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα εκχυλίσματα (υδατικά, αιθανολικά και μεθανολικά) της αμπέλου, ενός φυτού με σημαντικές βιολογικές ιδιότητες. Υπάρχουν σημαντικές διαφοροποιήσεις στη σύσταση των σταφυλιών και κατά προέκταση στη βιολογική τους δράση ανάμεσα στις διάφορες ποικιλίες. Παρότι γνωρίζουμε αρκετές από τις βιολογικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων από σταφύλια, οι μηχανισμοί στους οποίους οφείλονται δεν έχουν αποσαφηνιστεί και θεωρείται σημαντική η διερεύνησή τους. Έρευνες σε εκχυλίσματα σταφυλιών (*vitis vinifera*) υποδεικνύουν την αντιβακτηριδιακή και αντιοξειδωτική τους δράση τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Πιστεύεται ότι οι σημαντικότερες ουσίες των σταφυλιών όσον αφορά τη βιολογική δράση είναι οι φυτικές πολυφαινόλες.

3.1 Αναστολή Ενζύμων από Φυτικά Εκχυλίσματα

Το φυτικό βασίλειο είναι αναμφισβήτητα μια πολύτιμη πηγή νέων φαρμακευτικών παραγόντων. Η φύση είναι πλούσια σε βιολογική και χημική ποικιλότητα και οι μοναδικές όσο και σύνθετες δομές των φυσικών προϊόντων δεν μπορούν εύκολα να αναπαραχθούν από την χημική σύνθεση. Εκχυλίσματα φυτών χρησιμοποιούνται συχνά για την αναστολή ενζύμων. Και είναι πολλά τα παραδείγματα θετικών αποτελεσμάτων τέτοιων μελετών. Το φάσμα των εφαρμογών της χρήσης φυτικών εκχυλισμάτων ως αναστολείς ενζύμων είναι ευρύ. Έχουν μελετηθεί πολλά φυτικά εκχυλίσματα ως πιθανοί αναστολείς ένζυμων που σχετίζονται με διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως το μεταβολικό σύνδρομο και το Alzheimer καθώς και η πιθανή δράση φυτικών εκχυλισμάτων ως αντικαρκινικοί παράγοντες.

Ιδιαίτερα τα για τα εκχυλίσματα αμπέλου, προηγούμενες έρευνες έχουν δείξει ότι αυτά περιέχουν συστατικά με ευεργετικές ιδιότητες. Έχει μελετηθεί η αναστολή που προκαλούν τα εκχυλίσματα από σπόρους σταφυλιού σε λιπάσες για την καταπολέμηση του μεταβολικού συνδρόμου που σχετίζεται με μια ευρεία γκάμα διαταραχών, όπως ο διαβήτης και η παχυσαρκία. Ακόμα μελέτες έχουν γίνει για τον χημειο-προστατευτικό ρόλο των εκχυλισμάτων αμπέλου κατά της καρκινογένεσης καθώς αναστέλλουν τη δράση της τοποϊσομεράσης I, ενός ενζύμου που παρουσιάζει αυξημένη δράση σε καρκινικά κύτταρα.

4. Σκοπός της Εργασίας

Σε αρκετές έρευνες η RNase A αποτελεί μοντέλο για τη μελέτη μελών της υπεροικογένειας των ριβονουκλεασών. Όπως αναπτύξαμε σε προηγούμενα κεφάλαια οι κύριοι λόγοι που καθιστούν την RNase A προσφιλές μοντέλο είναι αφενός η αξιοσημείωτη σταθερότητα της και η ευκολία καθαρισμού της και αφετέρου ο υψηλός βαθμός συντήρησης του ενεργού κέντρου του ενζύμου, σε σχέση με τα άλλα μέλη της υπεροικογένειας.

Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτελεί η μελέτη της επίδρασης πολυφαινολικών εκχυλισμάτων αμπέλου (*vitis vinifera*), της ποικιλίας ασσύρτικου, στην λειτουργία του ενζύμου ριβονουκλεάση A. Η πειραματική διαδικασία αφορούσε την κινητική μελέτη του ενζύμου παρουσία των εκχυλισμάτων αυτών.

Απώτερος στόχος της έρευνας είναι η ενδεχόμενη εύρεση νέων μορίων βιο-ιατρικού ενδιαφέροντος, που πιθανών βρίσκονται στα εκχυλίσματα της αμπέλου, και την αξιοποίησή τους στο σχεδιασμό νέων εν δυνάμει ογκοκατασταλτικών φαρμάκων.

5. Υλικά και Μέθοδοι

5.1 Αντιδραστήρια-Υλικά

5.1.1 Αντιδραστήρια

- ❖ Βοεία παγκρεατική ριβονουκλεάση A (type XII-A). Εταιρία Sigma-Aldrich (Athens, Greece).
- ❖ Ribonucleic acid transfer baker's yeast . Εταιρία Sigma-Aldrich (Athens, Greece).
- ❖ Ρυθμιστικά διαλύματα :
 - Οξικό οξύ [CH_3COOH]/ οξικό νάτριο [$\text{C}_2\text{H}_3\text{Na}_2$], το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα κινητικά πειράματα σε συγκέντρωση 0,1 M και pH=6, προκειμένου να διατηρείται σταθερό το pH, αλλά και η ιοντική ισχύς. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε ως διάλυμα χρήσης, δηλαδή ως το διάλυμα στο οποίο διαλύεται το ένζυμο RNase A.
 - Sodium Phosphate (NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4) σε συγκέντρωση 50mM και pH=7,4, το οποίο αποτέλεσε και το διάλυμα της αντίδρασης (reaction buffer). Να σημειωθεί πως στο διάλυμα αντίδρασης διαλύεται και το υπόστρωμά μας (tRNA).
 - Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης (stop solution). Χρησιμοποιήθηκαν 40mM Lanthanum Nitrate [$\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6(\text{H}_2\text{O})$] και 6% Perchloric acid [HClO_4].

5.1.2 Χημικά

Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Reasearch Organics
Acetic acid (100%)	Merck
Sodium acetate	Merck
NaH_2PO_4	Merck
Na_2HPO_4	Merck
Lanthanum Nitrate	Sigma
Perchloric acid (60%)	Fluca

5.1.3 Όργανα-Υλικά

- Αναλυτικός Ζυγός (Orma, Italy)
- Πεχάμετρο (Metrohm 691, Switzerland)
- Γωνιομετρική κεφαλή (Hampton Research, U.S.A.)
- Κυψελίδες-οπτικής διαδρομής 1cm (Hellma QS, Germany)
- Φασματοφωτόμετρο ορατού υπεριώδους (Genesis 10 UV)



5.2 Μέθοδοι

5.2.1 Κινητική μελέτη της ριβονουκλεάσης A

Μέτρηση συγκεντρώσεων

Η μέτρηση των συγκεντρώσεων του ενζύμου και του υποστρώματος γίνεται φωτομετρικά. Η συγκέντρωση υπολογίζεται σύμφωνα με την σχέση:

$$\text{Συγκέντρωση} = \text{Απορρόφηση} / \text{Σταθερά απορρόφησης}$$

Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση της ριβονουκλεάσης A προσδιορίστηκε φωτομετρικά σε μήκος κύματος 278 nm χρησιμοποιώντας συντελεστή μοριακής απορρόφησης $\epsilon_{278} = 9800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ για κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1 cm (Sela & Anfinsen, 1957-Dostal & Matousek, 1973). Η συγκέντρωση του υποστρώματος tRNA προσδιορίζεται, επίσης, φωτομετρικά σε μήκος κύματος 260 nm χρησιμοποιώντας ως

συντελεστή μοριακής απορρόφησης $\epsilon_{260}=9250 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και θεωρώντας ότι τιμή οπτικής απορρόφησης ίση με τη μονάδα αντιστοιχεί σε συγκέντρωση ίση με 1,42 μM .

5.2.2 Περιγραφή της μεθόδου

Η δραστηριότητα της RNase A προσδιορίστηκε ακολουθώντας μια μέθοδο κατακρήμνισης και έχοντας ως υπόστρωμα tRNA ζύμης σύμφωνα με τα πειράματα των Anfinsen et al. (Anfinsen C.B. et al. *J Biol. Chem.* 1954)

Κινητική μελέτη της Ριβονουκλεάσης Α

Προσδιορισμός IC_{50} εκχυλισμάτων

Η παρουσία αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας υδρόλυσης του tRNA και απελευθέρωσης μορίων CMP. Η μείωση αυτή μπορεί να εκφραστεί ως αναστολή σύμφωνα με γνωστά μοντέλα ενζυμικής αναστολής.

Η σταθερά IC_{50} ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Ο προσδιορισμός της προϋποθέτει την μελέτη της κινητικής του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή της IC_{50} και για συγκεκριμένη συγκέντρωση tRNA. Η συγκέντρωση tRNA που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της IC_{50} είναι η 7 μM . Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε στη μέθοδο του Anfinsen (1954) , όπως αυτή τροποποιήθηκε από την Slifman (1986).

Για τον προσδιορισμό απαιτείται η παρασκευή ενός διαλύματος χρήσης (reaction buffer), στο οποίο διαλύεται το υπόστρωμα (tRNA) και περιέχει τα έξης αντιδραστήρια: 0,2 M NaH_2PO_4 και 0,2 M Na_2HPO_4 με pH 7,4.

Αρχικά, παρασκευάζονται μεγάλης συγκέντρωσης διαλύματα (stock solutions) όλων των αντιδραστηρίων, κατάλληλοι όγκοι των οποίων αναμιγνύονται για την παρασκευή του διαλύματος χρήσης λίγο πριν πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός. Σε κάθε διάλυμα προστίθεται και διάλυμα εκχυλίσματος διαφορετικής συγκέντρωσης. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονται κυρίως ανάμεσα στα 1 $\mu\text{g/mL}$ και 100 $\mu\text{g/mL}$ και εξετάζουμε και τις συγκεντρώσεις 0,1 $\mu\text{g/mL}$ και 100 $\mu\text{g/mL}$ ως ακραίες τιμές. Η πειραματική διαδικασία είναι η ακόλουθη. Μετά τη διάλυση του tRNA στο διάλυμα χρήσης, υπολογίζονται οι ακριβείς ποσότητες αντιδραστηρίων

που απαιτούνται για την αντίδραση. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 600 μl , ενώ η έναρξή της πραγματοποιείται μόλις προστεθεί το ένζυμο. Η RNase A έχει αραιωθεί με το ρυθμιστικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ (pH 5,5-6), ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 10 nM. Η αντίδραση σταματά μετά από ένα λεπτό (1 min) αναμιγνύοντας 300 μl από το διάλυμα αντίδρασης με 300 μl διαλύματος (stop solution) που αποτελείται από 40mM Lanthanum Nitrate και 6% Perchloric acid (συμβάλλουν στην κατακρήμνιση του μη υδρολυμένου tRNA). Το πείραμα πραγματοποιείται στους 30°C σε pH 7,4. Γι αυτό το λόγο, πριν την έναρξη της αντίδρασης το διάλυμα χρήσης μαζί με το υπόστρωμα επωάζονται για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 30 °C. Κατόπιν, όπως προαναφέραμε, προστίθεται το ένζυμο, οπότε και ξεκινά η αντίδραση. Μετά από 1 min αφού έχει προστεθεί η RNase A, σταματάμε την αντίδραση με stop solution και τοποθετούμε τους σωλήνες στον πάγο. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρούνται σε θερμοκρασία 4 °C, στις 14.500 στροφές (rpm) για 15 min, όπου καθιζάνει το αδιάλυτο υπόστρωμα που δεν χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση. Έπειτα, παραλαμβάνονται 580 μl από το υπερκείμενο και φωτομετρούνται. Να σημειωθεί πως για κάθε πείραμα, χρησιμοποιείται μια κυψελίδα υπεριώδους και πως πάντα υπάρχει ένα διάλυμα αναφοράς (τυφλό) το οποίο περιέχει ότι και το εκάστοτε δείγμα εκτός από το ένζυμο και το υπόστρωμα, με το οποίο μηδενίζουμε το φωτόμετρο πριν φωτομετρήσουμε το δείγμα. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του υδρολυμένου tRNA που παράγεται, πραγματοποιείται με καταγραφή της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 260nm.

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity, $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) αποτελεί έκφραση της ποσότητας, αλλά και της δραστηριότητας ενός ένζυμου. Ορίζεται ως τα mg του ένζυμου που προκαλούν μετατροπή 1 μmol υποστρώματος (ή παρασκευή 1 μmol προϊόντος) ανά 1 λεπτό σε καθορισμένες συνθήκες.

5.2.3 Επεξεργασία κινητικών δεδομένων για τον υπολογισμό της IC50

Η στατιστική επεξεργασία των κινητικών δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα Grafit, εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση (non-linear regression) και θεωρώντας ότι τα σφάλματα είναι ίδια για κάθε πειραματική τιμή (ομοσκεδαστικότητα 'simple weighting'). Εφ' όσον η αντίδραση πραγματοποιείται σε έναν μόνο χρόνο, 1min, η εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ειδικής δραστηριότητας είναι η εξής:

$$\text{Sp. activity} = (\text{OD-Blank}) / 516,4 * 0,006 \quad \mu\text{moles CMP} / \text{min} * \text{nmoles ενζύμου}$$

όπου 516,4: είναι ο συντελεστής απορρόφησης του tRNA

0,006: τα nmoles του ενζύμου στην αντίδραση

Στον προσδιορισμό της σταθεράς IC₅₀, οι ειδικές δραστηριότητες παρουσία αναστολέα μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα. Από τα πειραματικά δεδομένα εξάγονται οι ειδικές δραστηριότητες του ενζύμου για την εκάστοτε περίπτωση και υπολογίζεται η επί τοις εκατό αναστολή για κάθε συγκέντρωση αναστολέα βάσει του τύπου:

$$\% \text{αναστολή} = \frac{\text{S.a.}_{\text{control}} - \text{S.a.}_i}{\text{S.a.}_{\text{control}}} \times 100\%$$

όπου: **S.a._{control}** : η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα

S.a._i : η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου παρουσία i συγκεντρώσεως αναστολέα

Η τιμή IC₅₀ υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

$$y = \frac{100\%}{1 + \left(\frac{x}{\text{IC}_{50}} \right)^s}$$

όπου: s : η κλίση της ευθείας

Στην εξίσωση θεωρείται ότι η παράμετρος y μειώνεται όσο η x αυξάνει

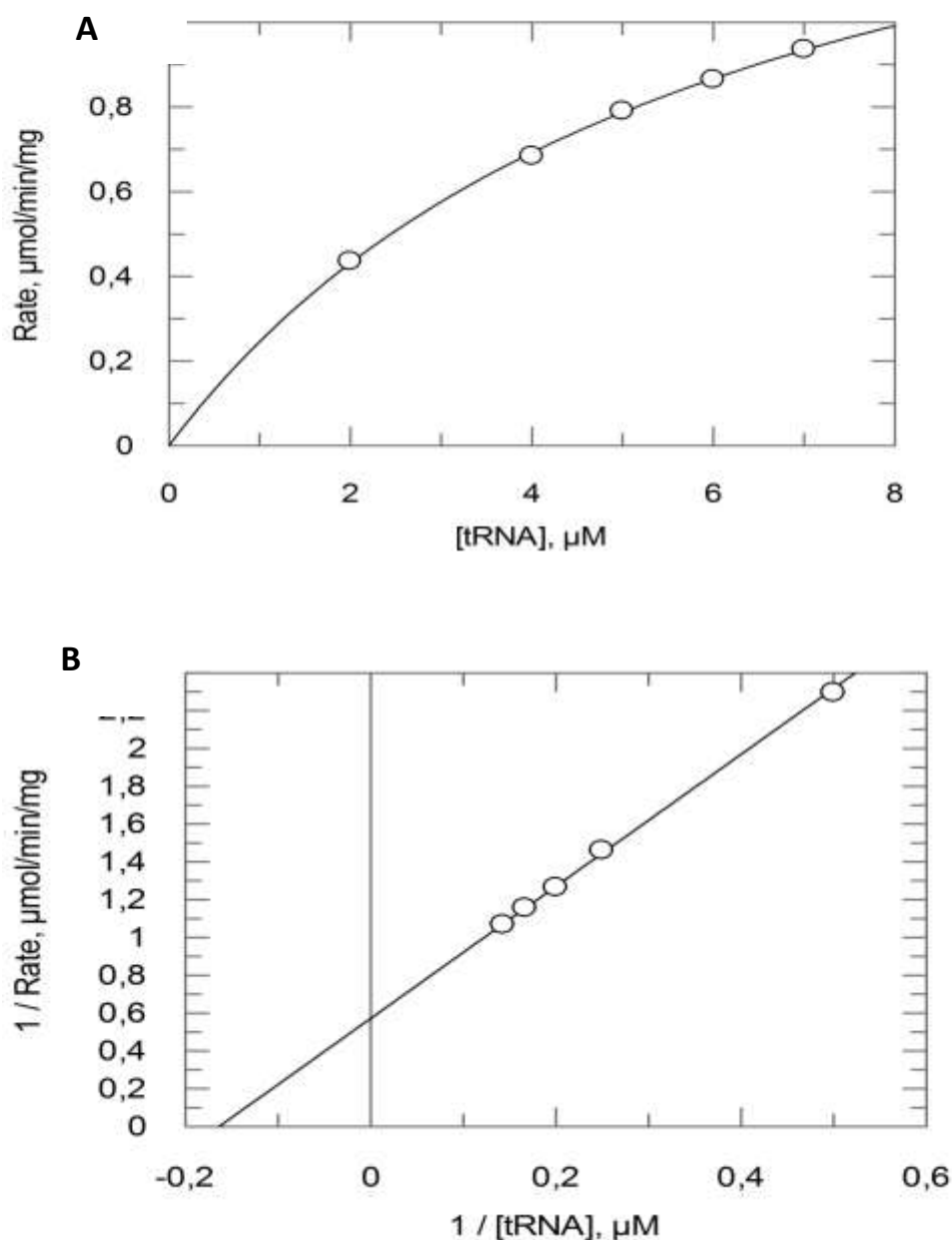
Το πείραμα για την εξαγωγή της IC_{50} θεωρείται επιτυχές, εφόσον υπάρχουν εκατέρωθεν της τιμής της τουλάχιστον δύο συγκεντρώσεις αναστολέα, που προκαλούν αναστολή από 10%-50% και 50%-90%. Η τιμή της IC_{50} προκύπτει από το διάγραμμα **%αναστολή=f([I])**. Από την τιμή της IC_{50} προκύπτει κατά προσέγγιση η τιμή της σταθεράς αναστολής K_i που αποτελεί όπως και η K_m έκφραση της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα της αντίδρασης παρουσία ενός αναστολέα βάση του τύπου:

$$IC_{50} = \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right) K_i$$

Όπου $[S]$ η συγκέντρωση του υποστρώματος.

6. Αποτελέσματα

Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι: $K_m=6,11 \pm 0,27 \mu M$, και $V_{max}=1,75 \pm 0,04 \mu mol \text{ CMP}/(mg \times min)$.



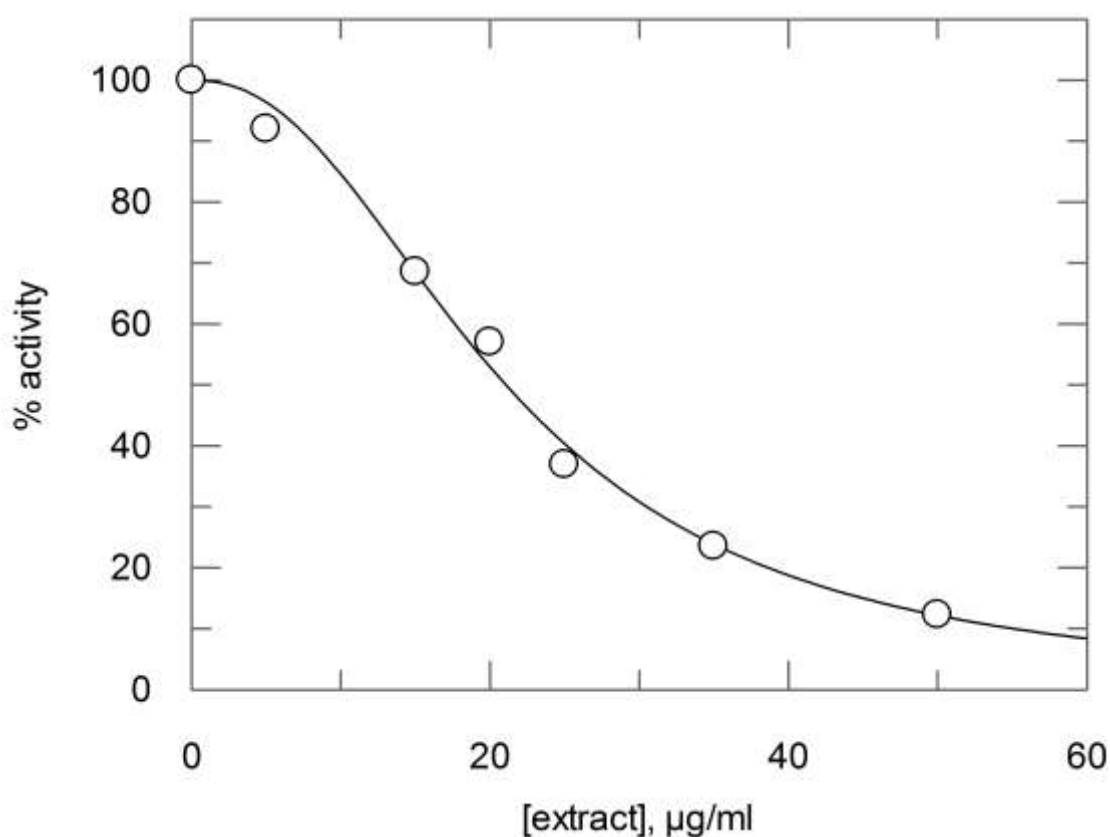
Εικόνα 13: Διάγραμμα κινητικής μελέτης της RNaseA σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος tRNA (2,0, 4,0, 6,0, 8,0 μM). **A.** Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος. **B.** Το αντίστροφο διάγραμμα Lineweaver-Burk που δείχνει τη σχέση του υποστρώματος και της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από το οποίο προκύπτουν οι τιμές K_m και V_{max} .

6.1 Προσδιορισμός του IC₅₀ της αναστολής του ενζύμου

Στα διαγράμματα που ακολουθούν προσδιορίζεται η τιμή IC₅₀ της αναστολής που παρατηρήθηκε για μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων του ασσύρτικου. Όπως έχει προαναφερθεί, η IC₅₀ είναι η συγκέντρωση του αναστολέα που προκαλεί αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου κατά 50%.

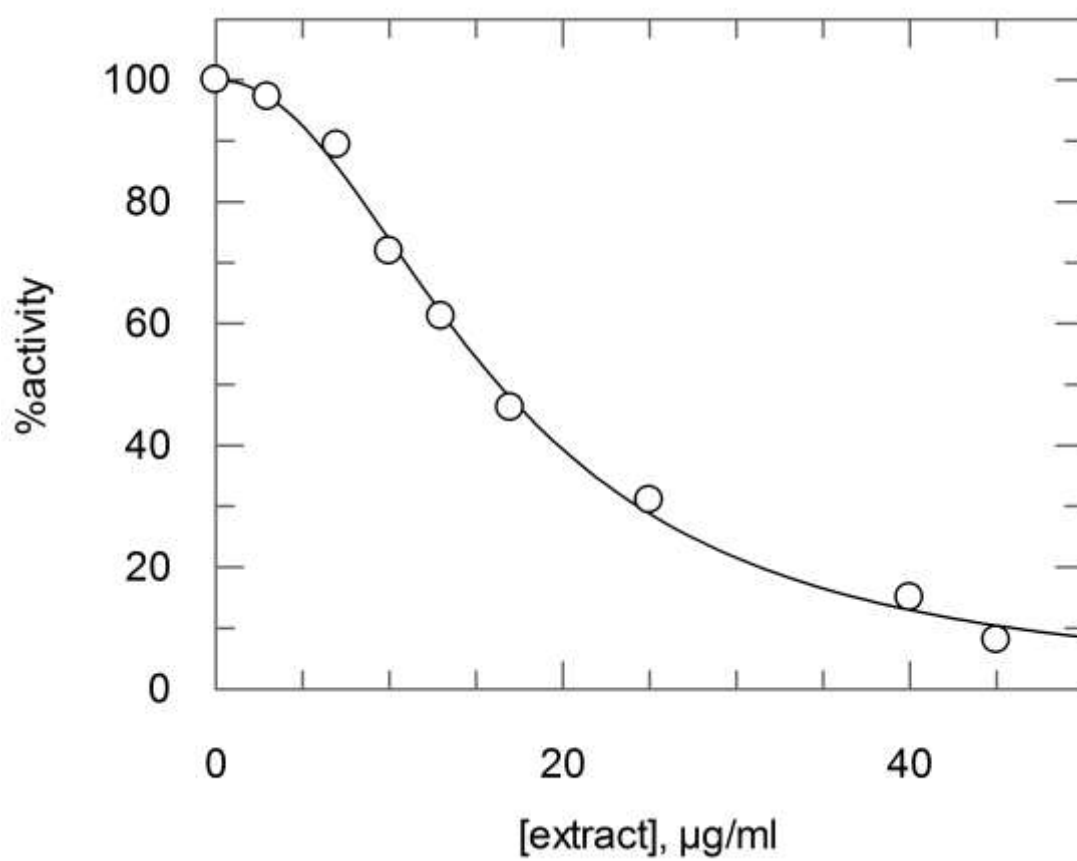
1) Ασσύρτικο Βόστρυχοι

$$IC_{50} = 21.06 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$$



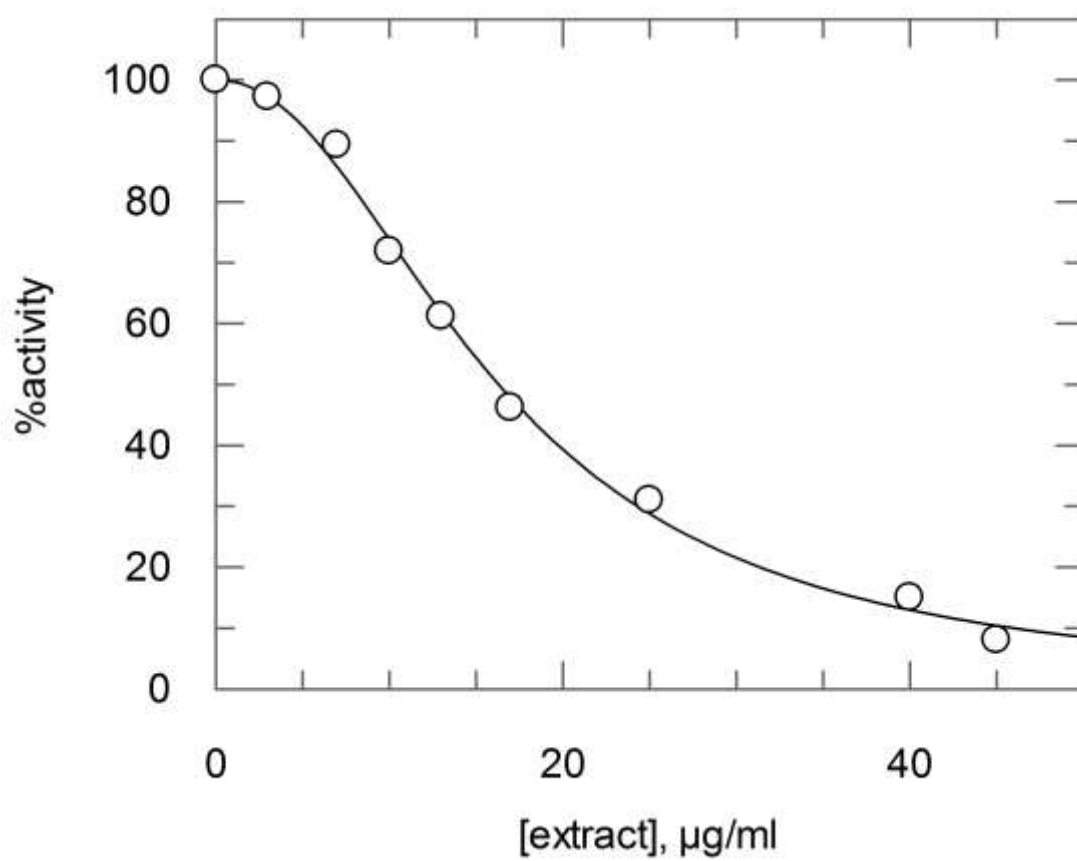
2. Ασσύρτικο Σαντορίνη Στέμφυλα

$$IC_{50} = 16.30 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$$



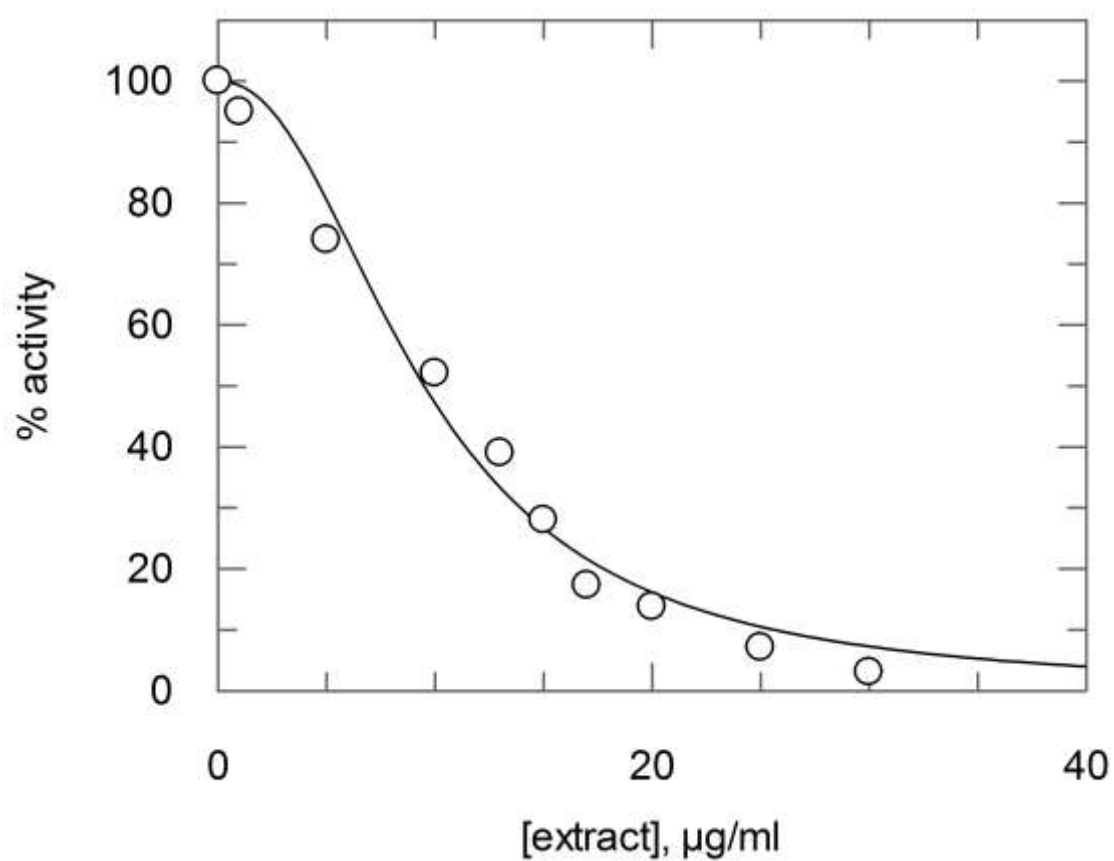
3. Ασσύρτικο Σαντορίνη 2008

$$IC_{50} = 36.41 \pm 0.6 \mu g/mL$$



4. Ασσύρτικο Γίγαρτα 2011

$$IC_{50} = 9.49 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$$



7. Συζήτηση

Για την παρούσα εργασία μελετήθηκε, στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, η αναστολή που μπορεί να προκαλέσουν πολυφαινολικά εκχύλισματα αμπέλου της ποικιλίας Ασσύρτικου στην ριβονουκλεάση Α. Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι $K_m=6,11 \pm 0.27 \mu\text{M}$, και $V_{\max}=1.75 \pm 0.04 \mu\text{mol CMP}/(\text{mg} \times \text{min})$, ενώ οι συγκέντρωσεις των εκχυλισμάτων που προκάλεσαν 50% αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας (IC_{50}) βρέθηκαν:

- 1) Ασσύρτικο Βόστρυχοι, $\text{IC}_{50} = 21.06 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$
- 2) Ασσύρτικο Σαντορίνη Στέμφυλα, $\text{IC}_{50} = 16.30 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$
- 3) Ασσύρτικο Σαντορίνη 2008, $\text{IC}_{50} = 36.41 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$
- 4) Ασσύρτικο Γίγαρτα 2011, $\text{IC}_{50} = 9.49 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν πως η αναστολή των εκχυλισμάτων είναι αρκετά σημαντική. Περαιτέρω έρευνα απαιτείται για την ταυτοποίηση του δραστικού συστατικού των εκχυλισμάτων και την *in vivo* αποτελεσματικότητά του.

Βιβλιογραφία

- Ali, H., Houghton, P.J. & Soumyanath, A. (2006). Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*, *Journal of Ethnopharmacology*, 107, 449–455
- Atta, A. H. & Mouneir, S. M. (2004). Antidiarrhoeal activity of some Egyptian medicinal plant extracts, *Journal of Ethnopharmacology*, 92, 303–309.
- Apostolou A., Stagos D., Galitsiou E., Spyrou A., Haroutounian S., Portesis N., Trizoglou I., A. Hayes W., Kouretas D. (2013) Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts, *Food and Chemical Toxicology*, Available online on <http://www.sciencedirect.com/>
- Bond, M. D. & Vallee, B. L. (1990). Replacement of residues 8-22 of angiogenin with 7-21 of RNase A selectively affects protein synthesis inhibition and angiogenesis, *Biochemistry*, 29(13): 3341-3349.
- Cafaro, V., Bracale, A., Formiggini, F., Notomista, E., D'Alessio, G. & Di Donato, A. (1998). Protein engineering of ribonucleases, *Biochimie*, 80, 905-909.
- Curran, T. P., R. Shapiro, et al. (1993). Alteration of the enzymatic specificity of human angiogenin by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 32(9): 2307-2313.
- D'Alessio, G., & Riordan, J. F. (1997). *Ribonucleases: Structures and Functions*. New York: Academic Press.
- D'Alessio, G., A. Di Donato, et al. (1991). Seminal RNase: a unique member of the ribonuclease superfamily. *Trends Biochem Sci*, 16(3), 104-106.
- Domachowske, J. B., Dyer, K. D., Adams, A. G. , Leto, T. L & Rosenberg, H. F. (1998). Eosinophil cationic protein/RNase 3 is another RNase A-family ribonuclease with direct antiviral activity. *Nucleic Acids Research*, 26(14), 3358–3363.
- Fett, J. W., Bethune, J. L et al. (1987). Induction of angiogenesis by mixtures of two angiogenic proteins, angiogenin and acidic fibroblast growth factor, in the chick chorioallantoic membrane. *Biochem Biophys Res Commun*, 146(3), 1122-1131.

- Filho, J.M.B., Medeiros, K.C.P., Diniz, M. F.M., Batista, L.M., Athayde-Filho, P. F., Silva M. S., da-Cunha, E.V.L & Quintans-Júnior, J.R.G.L. J. (2006) Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16(2): 258-285.
- Hallahan, T. W., Shapiro, R., et al. (1992). Importance of asparagine-61 and asparagine-109 to the angiogenic activity of human angiogenin. *Biochemistry* 31(34), 8022-8029.
- Kao, R. Y., Jenkins, J. L., Olson, K. A., Key, M.E., Fett, J.w. & Shapiro, R. (2002). A small-molecule inhibitor of the ribonucleolytic activity of human angiogenin that possesses antitumor activity, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(15), 10066-10071.
- Kudi, A.C. & Myint, S.H., (1999). Antiviral activity of some Nigerian medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 68, 289–294.
- Leland, P. A., Schultz L. W. Kim B.M., Raines R.T., (1998). "Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(18): 10407-10412.
- Leonidas, D. D., Chavali, G. B. et al. (2003). High-resolution crystal structures of ribonuclease A complexed with adenylic and uridylic nucleotide inhibitors. Implications for structure-based design of ribonucleolytic inhibitors., *Protein Sci* 12(11), 2559-2574.
- Moussaoui, M., Nogues, M. V. et al. (1998). The subsites structure of bovine pancreatic ribonuclease A accounts for the abnormal kinetic behavior with cytidine 2',3'-cyclic phosphate. *J Biol Chem* 273(40), 25565-25572.
- Rochaa, L.G., Almeida, J.R.G.S., Mace^dob, R.O. & Barbosa-Filho, J.M, (2005). A review of natural products with antileishmanial activity, *Phytomedicine*, 12, 514–535
- Rollinger, J. M. , Kratschmar, D. V., Schuster, D., Pfisterer, P. H., Gumy, C., Aubry, E.M., Brandstötter, S., Stuppner, H., Wolber, G. & Odermatt, A. (2010). 11b-Hydroxysteroid dehydrogenase 1 inhibiting constituents from *Eriobotrya japonica* revealed by bioactivity-guided isolation and computational approaches. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 1507–1515
- Rosenberg, H. F. (2008). RNase A ribonucleases and host defense: an evolving story. *J Leukoc Biol*, 83(5), 1079-1087.

- Rybak, S. M., Auld, D. S. et al. (1989). C-terminal angiogenin peptides inhibit the biological and enzymatic activities of angiogenin. *Biochem Biophys Res Commun*, 162(1), 535-543.
- Shapiro, R. & B. L. Vallee (1989). Site-directed mutagenesis of histidine-13 and histidine-114 of human angiogenin. Alanine derivatives inhibit angiogenin-induced angiogenesis. *Biochemistry*, 28(18), 7401-7408.
- Stryer, L., 1997 . *Biochemistry*, 3th ed. W.H. Freeman.